

УДК 616.24-036.12-036.65-078:575

Методика определения гена 16S рРНК бактерий в изучении респираторного микробиома

Рузанов Д. Ю.¹, Митьковская Н. П.^{1,3}, Воропаев Е. В.²,
Осипкина О. В.², Буйневич И. В.²

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр «Кардиология»,
г. Минск, Республика Беларусь

В исследовании была поставлена цель изучить возможности методики определения гена 16S рРНК бактерий в определении бактериального спектра обострения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

Перспективно оценены 68 госпитализированных пациентов с обострением ХОБЛ. Использовались молекулярно-генетическое определение гена 16S рРНК бактерий и культуральные микробиологические методики из материала бронхиального дерева, полученного при защищенной браш-биопсии и рутинные микробиологические исследования мокроты.

Бактериальные агенты были выявлены в 91,2% случаев обострения ХОБЛ. Так, *Pseudomonas aeruginosa* выявлялась в биопсийном материале в 1,8 раза чаще, чем при использовании рутинных методик. Определены паттерны течения ХОБЛ с частыми обострениями, инфекционного обострения и псевдомонадной этиологии обострения.

Использование методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК позволяет верифицировать бактериальный спектр обострения ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, 16S рРНК, метагеном.

Введение. Ген 16S рРНК — один из трех основных типов рРНК, образующих основу рибосом прокариот. Цифры в названии рРНК равны значению константы седиментации. Соответственно, для данной молекулы это значение равно 16S (единиц Сведберга). Всего в прокариотических микроорганизмах обнаружено три типа рРНК: 23S и 5S в большой субъединице рибосомы (50S), 16S в малой субъединице рибосомы (30S). Аналогично константы двух других молекул рРНК равны 23S и 5S соответственно. Эукариотическим аналогом 16S рРНК является 18S рРНК [1]. К настоящему времени изучены последовательности нуклеотидов в 16S рРНК и 18S рРНК для более чем 400 разных видов живой природы. Последовательность гена 16S рРНК главным образом используется в исследовании филогенетики бактерий и архей. С 2010 г. последовательность гена 16S рРНК применяется для медицинских исследований патогенных бактерий. Полные последовательности генов 16S рРНК, как и многих других, собирают из чтений — определенных нуклеотидных последовательностей, полученных после секвенирования. Секвенирование проводится на платформе *Illumina* (длина чтений достигает 250 пар оснований); с использованием технологии секвенирования по Сэнгеру (длина чтений — до 1000 пар оснований); с использованием ионного полупроводникового секвенирования (длина чтений — до 200 пар оснований). Далее чтения сопоставляются с референсной последовательностью гена 16S рРНК, таким образом из множества чтений собирается полная последовательность гена. Последовательности генов 16S рРНК определены для типовых штаммов бактерий и архей и собраны в открытые базы данных, таких как NCBI. Тем не менее, качество отсеквенированных последовательностей, содержащихся в подобных базах данных, часто не проверяется. В результате этого широко используются вторичные базы данных, содержащие только последовательности генов 16S рРНК [2].

В данном исследовании мы изучали возможности методики определения гена 16S рРНК бактерий в определении бактериального спектра обострения хронической обструктивной болезни легких



с использованием защищенного забора материала с целью этиологического назначения антибиотиков. В рутинной практике назначение антибактериальных лекарственных средств (АБЛС) проводится, как правило, эмпирически [3, 4]. Инфекционные обострения могут быть вызваны активным размножением колонизированных бактерий или инфекцией дыхательных путей новыми штаммами микроорганизмов. Поскольку пациенты с ХОБЛ, вероятно, имеют хроническую бактериальную колонизацию, микробиологические исследования мокроты трудно интерпретировать, если только предшествующие данные культуры недоступны для сравнения. Поэтому существует мнение, что рутинное микробиологическое исследование мокроты не информативно [5]. Методы высокопроизводительного секвенирования произвели революцию в исследованиях микробиоты легких, что привело к пониманию того, что здоровые легкие не являются стерильными. Несколько исследований микробиоты здоровых и пациентов с ХОБЛ с использованием бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и мокроты были описаны с использованием молекулярных методов [6]. В этих исследованиях использовались образцы, полученные через верхние дыхательные пути, такие как индуцированная мокрота, бронхоальвеолярный лаваж и эндотрахеальный аспират. Многие из этих исследований идентифицировали оральные бактерии в образцах легких нижних дыхательных путей. Микробиота легких была почти неотличима от микробиоты полости рта, но авторы не смогли определить, были ли их результаты следствием аспирации и загрязнения бронхоскопа во время введения через рот.

У пациентов с обострением ХОБЛ, которые отвечают критериям антибактериальной терапии, необходимо учитывать спектр традиционных респираторных патогенов, такие как *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* и *Streptococcus pneumoniae* [7]. Вероятность атипичных бактерий обычно не рассматривается. Антибиотики, рекомендованные GOLD, включают амоксициллин/клавуланат, макролид или доксициклин, если не требуется активность в отношении устойчивых организмов, основанная на клинических и анамнестических факторах. В большинстве клинических рекомендаций по антибиотикотерапии обострений ХОБЛ амоксициллин/клавуланат заслуженно рассматривается как АБЛС стартовой терапии. К его достоинствам относится высокая биодоступность при приеме внутрь, накопление в тканях и жидкостях организма, широкий спектр антибактериальной активности по отношению к грамотрицательным возбудителям, способным к продукции β -лактамаз (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*), некоторым энтеробактериям (*Klebsiella pneumoniae* и др.), метициллиночувствительным *Staphylococcus aureus* и неспорообразующим анаэробам. У пациентов, использовавших антибиотики последние 30 дней или при наличии рецидивирующих респираторных инфекций, показаны другие классы антибиотиков и/или идентификация микроорганизмов с проведением теста лекарственной чувствительности [8, 9]. Однако в июле 2016 г. FDA заявило о недостаточно изученной безопасности класса фторхинолонов с позиции отдаленных необратимых нежелательных лекарственных реакций, таких как эффекты со стороны центральной нервной системы, периферическая нейропатия и тендинит или разрыв сухожилий, суициды и др. [10]. Поэтому в рекомендациях Американского торакального общества фторхинолоны не рекомендуются для лечения острых обострений ХОБЛ, если только у пациента нет тяжелой аллергии на бета-лактамы и отсутствуют другие доступные варианты лечения [11].

В Республике Беларусь фторхинолоны широко используются в лечении респираторной патологии, в том числе неосложненной, хотя возможность нежелательных реакций, вероятно, недооценена. Но и высокую активность по отношению к *S. pneumoniae*, включая мультирезистентные штаммы, респираторных фторхинолонов (левофлоксацин, моксифлоксацин, гатифлоксацин), нельзя сбрасывать со счетов. При этом респираторные фторхинолоны сохраняют высокую активность и в отношении грамотрицательных микроорганизмов (*H. influenzae* и *M. catarrhalis*) и внутриклеточных патогенов.

Важным фактором этиологической терапии ХОБЛ является верификация вероятного возбудителя и определение лекарственной чувствительности, однако ряд факторов сдерживают использование культуральных методов выявления бактериального тригераинфекционного обострения ХОБЛ. Это длительность и низкая чувствительность проводимого исследования. В этой связи представляется актуальным использование современных молекулярно-генетических методов, воспроизводимых в рутинной лабораторной и клинической практике.

Цель работы — изучение возможности методики определения гена 16S рРНК бактерий в определении бактериального спектра острого обострения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) с использованием защищенного забора материала.

Материалы и методы. Проспективно оценены пациенты с диагнозом «ХОБЛ, обострение», госпитализированные в пульмонологические отделения УЗ «Гомельская областная туберкулезная клиническая больница» (ГОТКБ) с января по ноябрь 2018 г. и давшие согласие на включение в исследо-

вание с использованием молекулярно-генетических исследований. ХОБЛ была диагностирована в соответствии с руководящими принципами Глобальной инициативы по обструктивным заболеваниям легких (GOLD). Обострение ХОБЛ предполагалось, если пациент имел по крайней мере два из трех симптомов: (а) увеличение одышки, (б) увеличение объема мокроты и (в) увеличение гнойности мокроты. Письменное информированное согласие было получено от всех участников исследования. Исследование одобрено комитетом по этике.

Пациенты не включались в исследование, если получили антибиотик в течение последних 48 ч до госпитализации; были выявлены ограниченные затемнения на рентгенограмме грудной клетки; обнаружены злокачественные новообразования и долгосрочное использование стероидов (>5 мг преднизолона или эквивалент в день более 3 месяцев). Пациенты были включены в исследование только один раз, даже если они повторно госпитализировались в течение периода исследования. Всего в исследование включено 68 пациентов.

Контрольные группы сформированы из пациентов, которые также были госпитализированы в пульмонологические отделения ГОТКБ с января 2018 г. по ноябрь 2018 г. с диагнозом «ХОБЛ, обострение». Материалом для исследования служила мокрота пациента, а в качестве рутинного микробиологического исследования — посев на питательный агар в лаборатории ГОТКБ (63 пациента). В 37 случаях у одного и того же пациента использовались методики защищенного забора материала и рутинного микробиологического исследования мокроты. Также спектр микробиома легких пациентов с ХОБЛ из группы исследования сравнивался с группой пациентов (8 дифференциально-диагностических случаев) без выявленной бронхолегочной патологии.

Для взятия клинического материала из бронхиального дерева с целью молекулярно-генетических исследований был использован разработанный алгоритм защищенной щеточной браш-биопсии. Алгоритм направлен на предотвращение контаминации микрофлорой из ротовой полости и верхних дыхательных путей. В качестве биоматериала для выделения ДНК использовали соскоб слизистой оболочки бронха пациентов. Браш-биоптаты вместе с фрагментом цитощетки, с помощью которой была выполнена биопсия, помещали в стерильную транспортную пробирку, содержащую транспортную среду.

Для изучения метагенома нижних дыхательных путей использована разработанная методика молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий в соскобах слизистой оболочки бронхов пациентов с обострением ХОБЛ.

Выделение ДНК проводили с использованием готовых коммерческих наборов, позволяющих выделять ДНК из небольшого количества образца. Для определения качества полученной ДНК проводили спектрофотометрический анализ. Для дальнейшего анализа использовали образцы, соотношение экстинкций A260/A280 которых составляло не ниже 1,85. В качестве контрольных образцов использовали паспортизованные чистые бактериальные культуры (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Рестрикционный анализ проводили с применением коммерческой рестриктазы согласно инструкции производителя. Детекцию продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза. Для окрашивания применяли раствор бромистого этидия. Для визуализации полученных результатов использовали видеосистему фирмы Bio-Rad (США) GelDocXR, для переноса изображения на компьютер и регистрации протоколов использовали программу QuantiOne той же фирмы. Для выполнения данного исследования в структуру прямого праймера был введен флуоресцентный краситель FAM, а в структуру обратного — HEX. Продукты ПЦР (ампликоны) обрабатывали рестриктазой MspI, согласно инструкции производителя. На следующем этапе проводили фрагментный анализ с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 фирмы Applied Biosystems (США), используя реагенты той же фирмы.

Анализ полученных результатов проводили при помощи программного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1 (Applied Biosystems, США), CLC Sequence Viewer 6.5.4. Полученные данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Учитывая, что культуральное исследование является «золотым» микробиологическим стандартом, у 39 пациентов пробы, полученные из браш-биоптатов или промывных вод бронхов, засеивали на питательные среды с кровяным агаром, средой желточно-солевого агара, средой Эндо, средой Сабу-ро. С целью обнаружения анаэробных микроорганизмов производился посев на чашку Петри с анаэробным агаром и помещался в контейнер с газогенерирующим пакетом Genbag anaer (bioMérieux, Франция). Оставшийся материал использовался для посева на среду «обогащения» (тиогликолевая

среда). Инкубация посевов производилась при температуре 35–37 °С и 5 % содержании CO₂ (CO₂-инкубатор Nuairе NU-4950E, США) в течение 24–48 ч, в анаэробных условиях в течение 72 ч.

Результаты и их обсуждение. Бактериальные агенты были выявлены в 91,2 % случаев (62 пациента) при использовании методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала полученного при защищенной браш-биопсии; в 66,7 % при прицельном микробиологическом исследовании на питательных средах с кровяным агаром, средой желточно-солевого агара, средой Эндо, средой Сабуро. Для сравнения бактериальные возбудители, выявленные из мокроты без использования методик защищенного забора материала, с использованием рутинных культуральных методик были обнаружены в 46,0 % случаев (29 пациентов), при этом спектр возбудителей в 55,2 % случаев существенно отличался.

В бронхиальном дереве было выделено 26 различных видов микроорганизмов, которые, по-видимому, представляют только часть метагенома нижних дыхательных путей (bronхов). Секвенирование по Сэнгеру позволило, как правило, определить один род микроорганизмов в случаях гетерогенной матрицы. Использование метода фрагментного анализа позволяет определить более широкий спектр родов микроорганизмов в метагеноме нижних дыхательных путей. На рисунке представлена частота встречаемости различных родов микроорганизмов, выявленных у пациентов с обострением ХОБЛ с использованием методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала полученного при защищенной браш-биопсии.

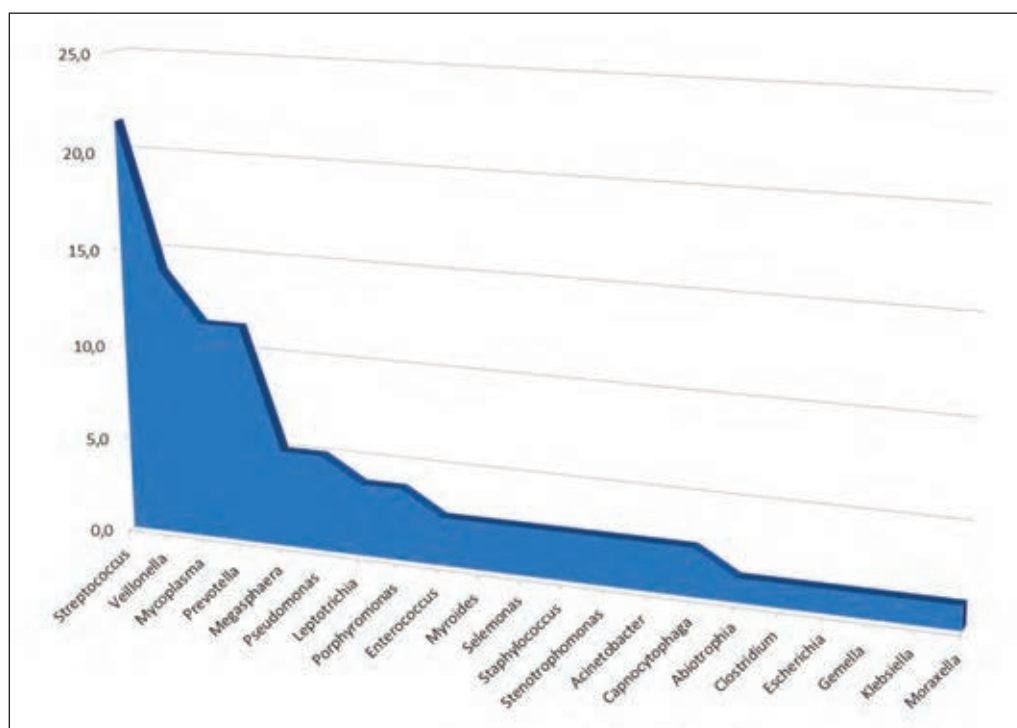


Рисунок — Преобладающие роды микроорганизмов в микробиоте бронхиального дерева пациентов с ХОБЛ без учета клинического течения и факторов риска

В 39 случаях пробы, полученные из браш-биоптатов или промывных вод бронхов, засевали также на питательные среды с кровяным агаром, средой желточно-солевого агара, средой Эндо, средой Сабуро: в 57,4 % наблюдались признаки инфекционного обострения. В результате бактериальные возбудители были выявлены в 32 (82,1 %) случаях.

Наиболее частыми выявленными патогенами были *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* Более редко выявлялись в диагностических титрах *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecium*, *Fusobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus lentus* и *Escherichia coli*. В низких диагностических титрах выявлено 11 различных видов организмов. У 9 пациентов выделено два и более патогенных возбудителя.

У одного пациента выделялось от одного до 8 микроорганизмов (геномов микроорганизмов). Множественные комбинации выявлялись, как правило, молекулярно-генетическими методами. При-

мечательно, что результаты детекции возбудителей при заборе материала промывными водами бронхов и защищенной браш-биопсией отличались (*Pseudomonas aeruginosa* выявлялась методикой молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК в биопсийном материале в 1,8 раза чаще). Для пациентов с редкими обострениями характерно существенно более выраженное разнообразие микроорганизмов: 23 вида микроорганизмов у пациентов с редкими обострениями против 11 штаммов от пациентов с частыми обострениями и 8 — с тяжелым обострением.

Мы сравнили характеристики пациентов, у которых были обнаружены потенциально-патогенные микроорганизмы (ППМ), в сравнении с не-ППМ. Так, инфекционный характер воспаления с выделением бактериального патогена коррелировал с возрастом ($p < 0,02$), обострениями два и более раз в год ($p < 0,001$), использованием системных кортикостероидов ($p < 0,005$) и снижением ОФВ1 ниже 50 % от должного ($p < 0,02$). Не выявлено существенной разницы в статусе курения и использования ингаляционных стероидов.

Также проанализированы характеристики пациентов, у которых были обнаружены псевдомонадные и непсевдомонадные микроорганизмы.

Выделение *P. aeruginosa* значительно чаще встречается у пациентов с частыми обострениями, требующих госпитализации, также использующих системные стероиды по сравнению с другими патогенами.

Для кластерного анализа пациенты разделены по течению ХОБЛ (в качестве основного критерия выбрана частота обострений в год) и степени тяжести обострения. Данные кластерного анализа подтверждают сокращение родового разнообразия микробиоты трахеобронхиального дерева пациентов с частыми и тяжелыми обострениями ХОБЛ. Причины данного явления не до конца понятны. Возможно частое использование антибиотиков у пациентов с частыми обострениями приводит к гибели колонистов бронхиального дерева с сокращением родового разнообразия и более частым обнаружением респираторных патогенов. Маркерами частых и тяжелых обострений по данным нашего исследования являются: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, обычно не культивируемая, *Mycoplasma pneumoniae* (о роли которой в обострении ХОБЛ имеются противоречивые мнения) и *Myroides odoratimimus*.

Изучение чувствительности к антибиотикам выделенных изолятов продемонстрировало устойчивость хотя бы к одному бета-лактаму в 29 (61,9 %) случаях. Анализ структуры чувствительности различных антибиотиков к *Pseudomonas aeruginosa* показал, что большинство изолятов демонстрируют устойчивость к аминопенициллинам, макролидам и цефалоспорином 4-го поколения, как к часто используемым антибиотикам у этих пациентов. Ципрофлоксацин и пиперациллин/тазобактам эффективны в 79,4 % изолятов, за которыми следуют аминогликозиды в 76 %. Данные АБЛС, по видимому, являются наиболее подходящими для большинства микроорганизмов, выделенных от госпитализированных пациентов с выявленными факторами индивидуального риска псевдомонадной этиологии инфекционного обострения ХОБЛ. Существенной проблемой оказалась антибиотикорезистентность *Acinetobacter*, который способен быстро формировать резистентность к различным классам антибактериальных препаратов. Выделенные культуры *A. baumannii* были резистентны к цефепиму (100 %), цефтазидиму (75 %). Высокий уровень резистентности был выявлен и к другим препаратам: к ципрофлоксацину (75 %), гентамицину (100 %), амикацину (50 %).

Заключение. При использовании методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала, полученного при защищенной браш-биопсии, бактериальные агенты были выявлены в 91,2 % случаев и в 46,0 % случаев при использовании рутинных микробиологических исследований, при этом спектр возбудителей в 55,2 % случаев существенно отличался. *Pseudomonas aeruginosa* выявлялась методикой молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий в биопсийном материале в 1,8 раза чаще.

Инфекционный характер воспаления с выделением бактериального патогена коррелировал с возрастом ($p < 0,02$), обострениями два и более раз в год ($p < 0,001$), использованием системных кортикостероидов ($p < 0,005$) и снижением ОФВ1 ниже 50 % от должного ($p < 0,02$). Для пациентов с редкими обострениями характерно существенно более выраженное разнообразие микроорганизмов (определение гена 16S рРНК бактерий): 23 вида микроорганизмов у пациентов с редкими обострениями против 11 штаммов от пациента с частыми обострениями или 8 с тяжелым обострением.

Кластерный анализ продемонстрировал, что данные полученные молекулярно-генетическими методами совпадают с результатами культуральных микробиологических методов. Антибиотикотерапия оказывает влияние на микробиом (уменьшая его разнообразие) респираторного тракта, что, возможно, связано с частотой и тяжестью обострения ХОБЛ.

Литература

1. Woese, C. R. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms / C. R. Woese, G. E. Fox // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1977. — Vol. 74, № 11. — P. 5088–5090.
2. Park, S. C. Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community / S. C. Park, S. Won // Genomics & Informatics. — 2018. — Vol. 16, № 4. — P. e24–24. DOI:10.5808/GI.2018.16.4.e24.
3. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with low serum procalcitonin values do not benefit from antibiotic treatment: a prospective randomized controlled trial / Wang Jin-Xiang [et al.] // International J. of Infectious Diseases. — 2016.— Vol. 48. P. 40–45. DOI:10.1016/j.ijid.2016.04.024.
4. Lin, C. Meta-analysis and systematic review of procalcitonin-guided treatment in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease / C. Lin, Q. Pang // Clinical Respiratory J. — 2016. DOI:10.1111/crj.12519.
5. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with acute exacerbation of COPD / C. Corti [et al.] // Inter. J. of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. — 2016. — Vol. 11. — P. 1381–1389. DOI: 10.2147/COPD.S104051.
6. Exacerbations of COPD / I. D. Pavord [et al.] // Inter. J. of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. — 2016. — Vol. 11 (Spec Iss). P. 21–30. DOI:10.2147/COPD.S85978.
7. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract / E. S. Charlson [et al.] // Am J. Respir. Crit. Care Med. — 2011. Vol. 184. — P. 957–963.
8. Relationship of Sputum Color to Nature and Outpatient Management of Acute Exacerbations of COPD / R. A. Stockley [et al.] // CHEST. — 2000. Vol. 117(6). — P. 1638–1645. DOI: 10.1378/chest.117.6.1638.
9. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / D. J. Vollenweider // Cochrane Database of Systematic Reviews. — 2012. — Vol. 12. (Art. No.): CD 010257. DOI: 10.1002/14651858.CD010257.
10. Is it possibly to identify exacerbations of mild to moderate COPD that do not require antibiotic treatment? / M. Miravittles // CHEST. — 2013. — Vol. 144(5). — P. 1571–1577. DOI: 10.1378/chest.13-0518.
11. U. S. Food & Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA updates warnings for oral and injectable fluoroquinolone antibiotics due to disabling side effects. — Updated 9. — August 2016. — Mode of access: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm511530.htm>. — Date of access: 01.06.2021.

Method for determining the 16S rRNA gene of bacteria in studying the respiratory microbiome

Ruzanov D. Yu.¹, Mitkovskaya N. P.^{1,3}, Voropaev E. V.², Osipkina O. V.², Buynevich I. V.²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²Gomel State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

³Republican Scientific and Practical Centre «Cardiology», Minsk, Republic of Belarus

The study set a goal to the possibilities of the method of determining the 16S rRNA gene of bacteria in the determination of the bacterial spectrum of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using a protected material sampling

68 Hospitalized patients with acute exacerbation of COPD were prospectively evaluated. Molecular genetic determination of the 16S rRNA gene of bacteria and cultural microbiological techniques from sputum and a bronchial tree material obtained using a protected brush biopsy were used.

Bacterial agents were detected in 91,2 % of cases of acute exacerbation of COPD. *Pseudomonas aeruginosa* was detected in the biopsy material 1.8 times more often than with the use of routine methods. Patterns of COPD with frequent exacerbations, infectious exacerbations and *Pseudomonas* etiology of exacerbations were determined.

Using the method of molecular-genetic determination of the 16S rRNA gene allows to verify the bacterial spectrum of acute exacerbation of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, 16S rRNA, metagenome.

Поступила 12.07.2021

